

第15回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

OPU-IVF によるウシ胚の生産

今井 敬

独立行政法人家畜改良センター

ウシの育種改良には Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET) による体内胚を採取および移植する方法が取られている。しかし、過剰排卵処理による胚生産はドナー牛の個体差や主席卵胞の影響を受け、特にドナーの卵巣には様々な形態および機能を有した卵胞が存在し、その卵胞のバラツキが過剰排卵処理に対する反応性として表現されるため、採卵成績にバラツキが大きく、一部のドナー牛では移植可能胚が採取できないという問題がある。そこで、これら MOET の問題を解決するために経膈採卵と体外受精を利用した胚生産 (OPU-IVF) が考案された。ウシの IVF 技術には受胎率が低い、流産が多い、過大子の発生、分娩兆候が弱いなどの問題点がある。このような背景の中で、OPU-IVF の開発および実用化に取り組み、効率的な胚生産技術として OPU-IVF を構築した。本講演では我々が実施している OPU-IVF について紹介する。

OPU 後に新たな卵胞波による発育卵胞の多くが正常卵子を育み、その優勢卵胞を機械的に除去することで7日後の卵胞に存在する卵子の正常性が高くなる卵胞発育同調法を見出した。次に、この卵胞発育同調法を過剰排卵処理の前処理に使うことで、発情時の大卵胞および採卵時の黄体数が増加することを報告した。さらに、この卵胞発育同調と過剰排卵処理を組合せ OPU-IVF の前処理として用い、形態学的に高品質であると判断出来る卵子の採取が可能であること、加えて、実際に、採取した卵子が胚盤胞への発生能が高く、かつ、発生した胚盤胞の細胞数が多く高品質であることを明らかにした。これらの技術を駆使し、OPU-IVF による胚生産は MOET よりも効率的且つドナーへの汎用性の高い胚生産技術であることを証明した。

また、本来胚生産が不可能と考えられる妊娠牛、性成熟前の若齢牛および繁殖障害牛からも OPU-IVF を用いて移植可能な胚が生産できることを実証した。さらに、この OPU-IVF の応用技術として、8細胞期胚を割球分離し、マイクロウェルによる培養で2分離胚を作製する方法により効率的な双子生産ができることを報告した。現在は体内成熟卵子の採取および性選別精子を使った OPU-IVF の開発に取り組んでいる。

一方、体外受精による胚生産技術では初期卵割で異常を示す胚の割合が高いこと、異常を示した卵割のうち、特に第1卵割で1細胞から3-4細胞へ直接卵割した胚が染色体数に異常を示す割合が高いことを明らかにした。また、第1卵割で異常の認められた胚は、その後胚盤胞へ発育しても受胎率が低いことを明らかにした。これらの知見をより発展および実証するため、胚の卵割様式と胚発生をより正確に把握する必要がある、胚の個別培養と Time-lapse cinematography (TLC) の応用を考えた。しかし、これまで TLC に対応した胚の個別培養法は開発されておらず、ポリエステルメッシュ、ニードルディプレッションおよび WOW 等を用いた個別培養法を検討し、射出成型型ポリスチレン製 WOW ディッシュを開発した。この WOW ディッシュによる個別培養法と TCL を用いることによって、卵割速度、卵割様式および胚盤胞の酸素消費量を指標にした IVF 胚の選別が可能となった。さらに、この方法で選別した胚の移植により75%以上の受胎率が得られ、しかも、生時体重において一般の体内胚由来の産子と差がないという画期的な胚選別培養法を確立した。

これらの OPU-IVF による胚生産における知見は、現在、家畜改良センターおよび県の研究機関における

育種改良の現場で使用され、乳用牛および肉用牛の育種改良に貢献をしている。さらに、卵割速度および卵割様式などによる受胎性の高い IVF 胚の選別により、子牛の生産効率の向上に大いに貢献できるものとして期待されている。

参考文献

1. Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K, Imai K.. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS ONE*, 7(5): e36627 (2012)
2. Sugimura S, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Hashiyada Y, Kaneda M, Yamanouchi T, Watanabe S, Nagai T, Konishi K, Imai K.. Follicular growth-stimulated cows provide favorable oocytes for producing cloned embryos. *Cellular Reprogramming*, 14(1): 29-37 (2012)
3. Sugimura S, Akai T, Somfai T, Hirayama M, Aikawa Y, Ohtake M, Hattori H, Kobayashi S, Hashiyada Y, Konishi K, Imai K. Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: a novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 83(6): 970-978 (2010)
4. Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, Imai K. Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by in vitro fertilization or parthenogenesis. *Journal of Reproduction and Development*, 56(2): 200-207 (2010)
5. Tagawa M, Matoba S, Narita M, Saito N, Nagai T, Imai K. Production of monozygotic twins by using blastomere separation technique and needle depression culture in cattle. *Theriogenology*, 69(5): 574-582 (2008)
6. Imai K, Tagawa M, Yoshioka H, Matoba S, Narita M, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 52(Suppl): S19-29 (2006)
7. 今井 敬, 田川真人, OPU-IVF によるウシ胚の作出, その汎用性. *日本胚移植学雑誌*, 28(1): 29-35 (2006)